

## Perbedaan Imunoekspresi Caspase-3 antara *Diffuse Large B-Cell Lymphoma* Subtipe *Germinal Center B-Cell-Like* dan *Non-Germinal Center B-Cell-Like*

Rosita Alfi Syahrin, Maria Francisca Ham, Agnes Stephanie Harahap,  
Benyamin Makes, Endang SR Hardjolukito

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia  
Jakarta

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Tipe terbanyak dari limfoma non-Hodgkin (LNH) sel B adalah *diffuse large B-cell lymphoma* (DLBCL) yang merupakan entitas heterogen. Hans membagi DLBCL menjadi subtipe *germinal center B-cell-like* (GCB) dan *non-germinal center B-cell-like* (non-GCB) dengan teknik pemeriksaan imunohistokimia menggunakan CD10, BCL6 dan MUM1. GCB mempunyai prognosis baik dan non-GCB berprognosis buruk. Caspase-3 adalah protein yang berperan utama dalam mekanisme apoptosis dan dapat mengalami mutasi somatik pada LNH. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbedaan imunoekspresi Caspase-3 pada DLBCL subtipe GCB dan non-GCB yang mungkin berkaitan dengan perbedaan prognosis kedua subtipe tersebut.

#### Metode

Pemeriksaan imunoekspresi Caspase-3 pada kasus pasien DLBCL yang terdiri atas subtipe GCB dan non-GCB dilakukan dengan teknik imunohistokimia. Subjek penelitian berasal dari blok parafin di Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM dan enam rumah sakit lainnya di Jakarta. Metode penelitian observasional deskriptif analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Prosedur pulasan imunohistokimia dengan cara *Trekavidin biotin* dan penilaian dilakukan oleh dua orang peneliti tanpa diketahui jenis subtipe GCB atau non-GCB.

#### Hasil

Ditemukan 41 kasus DLBCL yaitu 18 kasus subtipe GCB dan 23 kasus subtipe non-GCB. Subtipe GCB memberikan hasil positif dengan pulasan Caspase-3 berjumlah 13 kasus (72%) dan negatif berjumlah 5 kasus (28%). Hasil yang didapatkan dari subtipe non-GCB yaitu positif berjumlah 5 kasus (22%) dan negatif berjumlah 18 kasus (78%). Terdapat perbedaan bermakna imunoekspresi Caspase-3 antara DLBCL subtipe GCB dengan subtipe non-GCB ( $p=0,002$ ). Imunoekspresi Caspase-3 menunjukkan positività yang lebih tinggi pada DLBCL subtipe GCB dibandingkan dengan subtipe non-GCB.

#### Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa imunoekspresi Caspase-3 pada kedua subtipe DLBCL berbeda secara bermakna, di mana lebih tinggi pada subtipe GCB dibandingkan pada subtipe non-GCB. Hal ini mungkin dapat menjelaskan latar belakang perbedaan prognosis di antara kedua subtipe tersebut.

**Kata kunci:** apoptosis, caspase-3, DLBCL, GCB, non-GCB.

### ABSTRACT

#### Background

The most common type of B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL) is diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) which is a heterogeneous entity. Hans divided DLBCL into germinal center B-cell-like (GCB) and non-germinal center B-cell-like (non-GCB) subtypes by using immunohistochemistry staining with CD10, BCL6 and MUM1. GCB subtype showed better prognosis than non-GCB subtype. Caspase-3 is a protein which plays a role in the mechanism of apoptosis and may have somatic mutation in NHL. This study was performed to analyze the difference of Caspase-3 immunoeexpression between GCB and non-GCB subtypes of DLBCL that may be related to different prognosis between these subtypes.

#### Methods

Immunoexpression examination of Caspase-3 in DLBCL cases, the GCB and non-GCB subtypes were performed by using immunohistochemistry technique. Research subjects were originated from paraffin blocks in the Department of Anatomical Pathology, FMUI/RSCM and from 6 other hospitals in Jakarta. Method of research was analytic descriptive observational with cross sectional approach. Immunohistochemical procedure were performed by using *Trekavidin biotin* and assessed blindly by two authors, without knowing the subtype of the cases.

#### Results

Forty-one cases of DLBCL, consisted of 18 GCB and 23 non-GCB cases. The number of GCB subtype which showed positive Caspase-3 staining was 13 cases (72%) and negative in 5 cases (28%). The number of non-GCB subtype which showed positive Caspase-3 staining was 5 cases (22%) and negative in 18 cases (78%). There was significant difference of Caspase-3 immunoeexpression between GCB and non-GCB subtype of DLBCL ( $p=0.002$ ). The positivity of Caspase-3 expression was higher in GCB subtype than non-GCB subtype of DLBCL.

#### Conclusion

This research showed that Caspase-3 immunoeexpression in the two subtypes of DLBCL was significantly different, which is higher in GCB subtype than in non-GCB subtype. This result may explain the background in prognosis different between both subtype.

**Key words :** apoptosis, caspase-3, DLBCL, GCB, non-GCB.

## PENDAHULUAN

Limfoma malignum adalah suatu penyakit keganasan yang berasal dari limfosit (sel T, sel B) dan sel *natural killer*. Limfoma malignum dibagi dalam dua kelompok utama yaitu limfoma Hodgkin dan limfoma non-Hodgkin (LNH). Dua kelompok ini dibagi lagi dalam beberapa tipe sesuai dengan klasifikasi WHO.<sup>1-3</sup>

Lebih dari 90% LNH di dunia merupakan limfoma yang berasal dari sel B matur. Angka kejadian LNH sel B matur mencapai sekitar 4% dari semua kasus baru keganasan setiap tahun di dunia. Tipe terbanyak dari LNH sel B adalah *diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified* (DLBCL, NOS), yaitu mencapai sekitar 30% dari seluruh kasus LNH di negara Barat, presentase yang lebih tinggi didapatkan di negara berkembang. Limfoma non-Hodgkin terjadi pada orang dewasa dengan median pada dekade ke-7, namun dapat juga terjadi pada anak-anak dan remaja. Penderita DLBCL sedikit lebih banyak pada laki-laki dibandingkan perempuan.<sup>3,4</sup>

*Diffuse large B-cell lymphoma* merupakan suatu entitas yang heterogen dengan pembagian klasifikasi berdasarkan kombinasi gambaran klinik, morfologik, imunofenotip dan genetik. Karakteristik DLBCL secara morfologik ditandai dengan inti sel tumor yang berukuran besar, vesikuler dengan anak inti yang nyata dan sitoplasma relatif sedikit, serta secara imunofenotip mengekspresikan penanda sel B. Penanda sel B diantaranya adalah CD20, CD79a, CD19, CD22, PAX5, BOB1 dan OCT2.<sup>2,4,5</sup>

Secara molekuler dengan pemeriksaan DNA *microarray*, DLBCL dapat dibagi menjadi 3 subtipe yaitu *germinal center B-cell-like* (GCB), *activated B-Cell-like* (ABC) dan tipe 3. Pembagian ini berperan penting untuk menentukan prognosis. *Diffuse large B-cell lymphoma* subtipe GCB mempunyai kesintasan lebih baik dibandingkan subtipe ABC dan tipe 3. *Diffuse large B-cell lymphoma* subtipe ABC memiliki kesintasan sama buruknya dengan tipe 3 dan masih terus dipelajari. Pemeriksaan DNA *microarray* ini sangat mahal dan tidak mudah dikerjakan, sehingga dilakukan pemeriksaan subtipe dari DLBCL dengan imunohistokimia yang lebih praktis dan mudah dilakukan.<sup>5,6</sup>

Pembagian DLBCL secara imunofenotip telah dilakukan oleh berbagai penelitian. Hans *et al*<sup>6</sup> membagi klasifikasi DLBCL menjadi subtipe

GCB dan non-GCB dengan menggunakan teknik pemeriksaan imunohistokimia terhadap antigen CD10, BCL6 dan MUM1. CD10 dan BCL6 merupakan penanda sel *germinal center* sedangkan MUM1 merupakan penanda sel *non-germinal center*. Kriteria Hans juga memberikan hasil yang serupa dengan pemeriksaan DNA *microarray* yaitu DLBCL subtipe GCB memiliki kesintasan yang lebih baik dibandingkan subtipe non-GCB.<sup>4-6</sup>

Beberapa penelitian menunjukkan kematian sel tumor pada pasien DLBCL yang menjalani kemoterapi tergantung pada induksi apoptosis. Gangguan pada sinyal kaskade apoptosis mungkin dapat menyebabkan resistensi terhadap kemoterapi. Terdapat dua jalur apoptosis pada sel tumor yaitu jalur ekstrinsik dan intrinsik. Kedua jalur tersebut akan mengaktifkan Caspase-3 sehingga terjadilah apoptosis. Apoptosis pada LNH sel B dapat melibatkan aktivitas Caspase-3.<sup>6,7</sup>

Pemeriksaan DLBCL sampai dengan subtipe GCB dan non-GCB pada saat ini sudah dilakukan secara rutin pada laboratorium imunohistokimia FKUI/RSCM. Kami melakukan penelitian dengan pemeriksaan Caspase-3 bertujuan untuk mengetahui perbedaan potensi apoptosis DLBCL subtipe GCB dan non-GCB yang mungkin dapat menjadi penjelasan perbedaan prognosis kedua subtipe tersebut.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional deskriptif analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Populasi penelitian adalah kasus *Diffuse Large B-cells Lymphoma* (DLBCL) subtipe GCB dan non-GCB di Departemen Patologi Anatomik FKUI/RSCM sejak Juli 2012 hingga Juni 2014. Sampel dipilih secara konsekutif pada tiap kelompok yang diteliti. Perhitungan besar sampel menggunakan rumus besar sampel analitik kategorik tidak berpasangan.<sup>8,9</sup> Penelitian dilakukan di Departemen Patologi Anatomik FKUI/RSCM selama bulan Agustus 2014 sampai dengan bulan November 2014. Kemudian dilakukan pulasan imunohistokimia Caspase-3 pada DLBCL subtipe GCB dan non-GCB dengan kontrol positif berasal dari tonsil manusia dan kontrol negatif berasal dari setiap kasus yang diteliti.

**Metode pewarnaan imunohistokimia Caspase-3.**

Jaringan pada blok parafin dipotong setebal 3 mikron dan diletakkan pada kaca benda yang telah dilapisi *poly-L-lysine* dan dilakukan pre-parasi sediaan dengan dilakukan pemanasan yang dilanjutkan dengan deparafinisasi menggunakan xylol dan rehidrasi dengan alkohol. Setelah itu dilanjutkan dengan inkubasi ke dalam larutan endogen peroksidase 0,5%. Selanjutnya dilakukan *antigen retrieval* selama 10 menit dalam buffer sitrat (pH 6,0) di dalam *microwave*, kemudian dicuci menggunakan *phosphate buffersaline* (PBS), lalu inkubasi dengan *blocking agent* Sniper. Inkubasi dengan antibody primer Caspase-3 (Abcam32150) dengan pengenceran 150 kali terlarut dalam serum dilakukan selama 1 jam. Dilanjutkan inkubasi antibodi sekunder Universal Link selama 15 menit, diikuti dengan Trekavidin-HRP selama 15 menit. Langkah selanjutnya ditetaskan kromogen diamino benzidine (DAB), pulasan inti dengan larutan *hematoxyllin lillie mayer* dan pencelupan dalam lithium carbonat selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan etanol dan *clearing* dengan xylol.

Penilaian hasil pulasan imunohistokimia Caspase-3 dilakukan oleh dua orang peneliti untuk menilai seluruh kasus tanpa diketahui jenis sub tipe GCB atau non-GCB. Pengamatan dilakukan pada daerah tumor yang terpulas dengan baik kemudian ditandai dan di foto beberapa tempat secara acak, sampai diperoleh 500 sel tumor pada 2 sampai 5 lapangan pandang besar, selanjutnya diproses menggunakan program komputer ImageJ. Sel yang menunjukkan positif pada inti dan/atau sitoplasma, ditandai dengan titik merah dan sel yang negatif ditandai dengan titik hijau. Nilai positif dicantumkan dalam persen menggunakan rumus  $X/500 \times 100\%$ , dengan X adalah jumlah sel tumor yang positif terhadap Caspase-3. Pulasan Caspase-3 dikatakan negatif jika ekspresi  $<50\%$  dan dikatakan positif bila ekspresi  $\geq 50\%$ .<sup>6,10</sup> Uji statistik menggunakan tabel *crosstab*, kemudian dilakukan uji normalitas, karena sebaran kasus tidak normal dilakukan uji Man-Whitney. Uji statistik ini menggunakan program SPSS 16.

**HASIL**

Penelitian ini mendapatkan 41 kasus yang masuk kriteria inklusi, sub tipe GCB berjumlah 18

kasus dan 23 kasus non-GCB. Kasus yang berasal dari Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM 27 kasus dan 14 kasus berasal dari 6 rumah sakit yang berbeda.

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian.

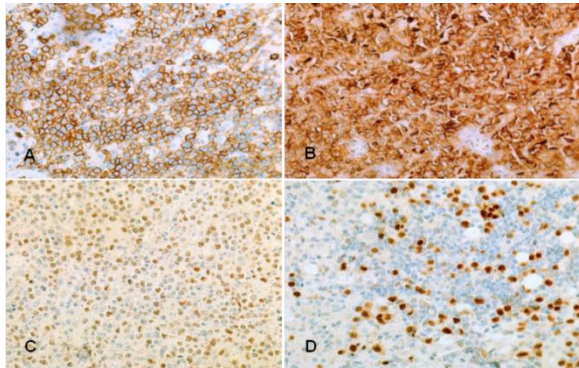
Variabel	n	%
Jenis kelamin		
Laki-laki	30	73,2
Perempuan	11	26,8
Umur (tahun)		
≤50 tahun	18	43,9
>50 tahun	23	56,1
Lokasi Tumor		
Kepala dan leher	24	58,5
Mata	2	4,9
Aksila dan inguinal	3	7,3
Saluran cerna	11	26,8
Payudara	1	2,4
Sub tipe DLBCL		
GCB	18	43,9
Non-GCB	23	56,1

Penilaian statistik pada penelitian ini tidak menunjukkan hubungan bermakna antara jenis kelamin dengan sub tipe GCB dan non-GCB dengan nilai  $p=0,411$ . Rerata usia pasien adalah 52,6 tahun dan median 51 tahun, hubungan bermakna antara usia pasien  $\leq 50$  tahun dan  $>50$  tahun dan sub tipe GCB dan non-GCB juga tidak ditemukan dengan nilai  $p=0,49$ . Penilaian hubungan antara lokasi tumor dan sub tipe GCB dan non-GCB didapatkan nilai  $p=0,484$  sehingga tidak ditemukan hubungan bermakna diantaranya.

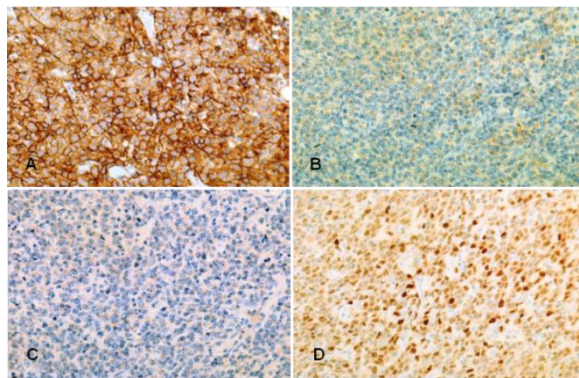
Tabel 2. Penilaian imunoekspresi Caspase-3 pada DLBCL sub tipe GCB dan non-GCB.

DLBCL	Caspase-3		Jumlah	P
	Positif (%)	Negatif (%)		
GCB	13 (72)	5 (28)	18	0,002
Non-GCB	5 (22)	18 (78)	23	
Jumlah	18 (100)	23 (100)	41	

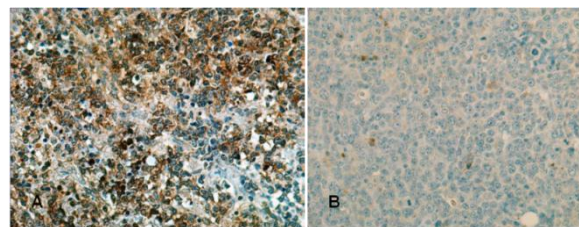
Berdasarkan hasil uji Man-Whitney didapatkan hasil  $p=0,002$ , hal ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang bermakna yaitu imunoekspresi Caspase-3 pada DLBCL sub tipe GCB lebih tinggi dibandingkan sub tipe non-GCB.



Gambar 1. DLBCL subtype GCB. A. Pulasan CD20, positif difus pada membran sel; B. Pulasan CD10, positif difus pada membran sel; C. Pulasan BCL6, positif pada inti sel; D. Pulasan MUM1, positif pada inti sel (400x).



Gambar 2. DLBCL subtype non-GCB. A. Pulasan CD20, positif difus pada membran sel; B. Pulasan CD10, negatif; C. Pulasan BCL6, negatif; D. Pulasan MUM1, positif pada inti sel (400x).



Gambar 3. Pulasan Caspase-3. A. DLBCL subtype GCB, pulasan Caspase-3 positif pada inti dan/atau sitoplasma dan ekspresi  $\geq 50\%$ ; B. DLBCL subtype non-GCB, pulasan Caspase-3 negatif (400x).

**DISKUSI**

Penderita DLBCL dalam penelitian ini memiliki karakteristik yang hampir sama dengan berbagai kepustakaan yaitu jenis kelamin laki-laki

(73,2%) lebih banyak dibandingkan perempuan (26,8%). Rentang umur yaitu 29-81 tahun, dengan median 51 tahun dan pasien dengan umur  $>50$  tahun (56,1%). Lokasi tumor paling banyak ditemukan pada regio kepala dan leher (58,5%) dan kedua terbanyak pada saluran cerna (26,8%).<sup>1,4,11</sup>

CD10 diekspresikan pada membran sel dan BCL6 diekspresikan pada inti sel terutama ditemukan pada sel-sel *germinal center* dalam keadaan normal. Imunoekspresi CD10 dan BCL6 memiliki *cut off*  $\geq 30\%$  pada DLBCL dapat berhubungan dengan prediksi kesintasan yang baik, walaupun beberapa penelitian memberikan hasil yang berbeda. Oleh karena itu CD10 dan BCL6 tidak dapat digunakan secara tunggal dalam memprediksi kesintasan pasien.<sup>4,5,12</sup>

MUM1 diekspresikan pada inti sel plasma dan sedikit tereksresi pada sel *germinal center*. Imunoekspresi MUM1 yang berlebihan pada DLBCL dapat dideteksi adanya translokasi kromosom dan berhubungan dengan buruknya prognosis. Hal ini dibuktikan melalui penelitian Hans dimana ekspresi MUM1 minimal 30% dari populasi sel berhubungan dengan secara bermakna dengan kesintasan yang buruk pada pasien.<sup>5,13,14</sup>

Imunoekspresi Caspase-3 pada sel-sel *germinal center* jaringan limfoid reaktif dapat terjadi karena aktivitas apoptosis yang tinggi. Caspase-3 dapat mengalami mutasi somatik pada tumor ganas ditandai dengan berkurangnya aktivitas apoptosis pada tumor ganas tersebut.<sup>15,16</sup> Hal ini mungkin dapat dihubungkan semakin tinggi tingkat agresif tumor maka akan semakin berkurang ekspresi Caspase-3.

Kasus DLBCL subtype GCB berjumlah 18 kasus, didapatkan 17 kasus CD10 (+) dengan hasil Caspase-3 positif pada 12 kasus dan negatif pada 5 kasus, serta 1 kasus CD10 (-), BCL6 (+) dan MUM1 (-) dengan hasil Caspase-3 positif. Kasus DLBCL subtype non-GCB berjumlah 23 kasus, seluruhnya menunjukkan pulasan CD10 (-). Didapatkan 6 kasus dengan pulasan BCL6 (-) dan MUM1 (+) dengan hasil Caspase-3 positif pada 2 kasus dan negatif pada 4 kasus. Didapatkan 17 kasus dengan pulasan BCL6 (+) dan MUM1 (+) dengan hasil Caspase-3 positif pada 3 kasus dan negatif pada 15 kasus. Jalur hubungan antara CD10, BCL6, MUM1 dan Caspase-3 belum dapat dijelaskan. Apabila dilihat dari hasil penelitian ini bahwa DLBCL subtype GCB memiliki imuno-

ekspresi Caspase-3 yang tinggi dibandingkan non-GCB mungkin terjadi karena mutasi somatik Caspase-3 lebih tinggi pada DLBCL subtype non-GCB.

Penelitian yang dilakukan oleh Provencio *et al.*<sup>6</sup> pada DLBCL dengan terapi rituximab dan menghasilkan pulasan negatif Caspase-3, berhubungan dengan kesintasan yang buruk ( $p=0,036$ ). Penelitian Berge *et al.*<sup>16</sup> yang menilai tingkat apoptosis untuk memprediksi hubungan dengan klinis pada *anaplastic large cell lymphoma* (ALCL) membuktikan bahwa pulasan positif Caspase-3 menunjukkan kesintasan yang baik.

Beberapa penelitian sebelumnya dikatakan bahwa terdapat metode lain dalam penilaian apoptosis selain menggunakan Caspase-3 yaitu *terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated nick and labeling* (TUNEL). Penilaian apoptosis lebih sensitif pada TUNEL dibandingkan Caspase-3 dengan alasan sel-sel yang mulai mengalami apoptosis dan mengalami fragmentasi DNA pada inti sel dapat dinilai dengan TUNEL lebih dini. Sel yang mengekspresikan Caspase-3 dinilai sebagai sel yang mengalami apoptosis tetapi masih dapat dihambat oleh protein penghambat apoptosis yaitu *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) pada jalur intrinsik dan *fllice inhibitory protein* (FLIP) pada jalur ekstrinsik yang menghambat kerja Caspase-8 dan Caspase-10 sehingga tidak dapat mengaktivasi Caspase-3.<sup>13,14,17</sup> Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan penilaian apoptosis menggunakan metode TUNEL untuk membuktikan apakah DLBCL subtype GCB memiliki indeks apoptosis yang tinggi sama seperti Caspase-3 atau berbeda.

Prediktor prognosis pada pasien DLBCL berhubungan juga dengan penilaian klinis. Hal ini dapat dilihat berdasarkan *International Prognostic Index* (IPI) dengan kriteria yaitu usia, stadium tumor (Ann Arbor stage), konsentrasi serum *lactate dehydrogenase* (LDH), keadaan pasien berdasarkan *Eastern Cooperative Oncology Grup* (ECOG) dan banyaknya massa tumor ekstranodal.<sup>4,7</sup> Keterbatasan penelitian ini adalah hanya mendapatkan data klinis yang minimal seperti usia, jenis kelamin dan lokasi tumor, karena tidak lengkapnya data klinis yang dikirimkan.

## KESIMPULAN

Penelitian ini mendapatkan hasil yaitu sebagian besar kasus DLBCL subtype GCB mengekspresikan Caspase-3. Kasus DLBCL subtype non-GCB sebagian besar menunjukkan hasil yang negatif dengan pemeriksaan Caspase-3. Hal ini mungkin dapat merupakan penjelasan perbedaan prognosis di antara kedua subtype tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Rosai J. Lymph nodes. In: Rosai J, editor. Rosai and Ackerman's surgical pathology. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2011. p.1806-38.
2. Weiss L.M. Non-Hodgkin lymphoma. In: Weiss L.M, editor. Lymph Nodes. 1<sup>th</sup>ed. New York: Cambridge University Press; 2008. p.123-75.
3. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Campo E, Pileri SA, Swerdlow SH. Introduction and overview of classification of the lymphoid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, *et al.*, editors. WHO classification of tumours of the haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.p.158-61.
4. Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan JKC, Gatter KC, *et al.* Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, *et al.*, editors. WHO classification of tumours of the haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.p.233-7.
5. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood. 2004; 103: 275-81.
6. Provencio M, Martin P, Garcia V, Candia A, Sanchez AC, Bellas C. Caspase 3a: new prognostic marker for diffuse large B-cell lymphoma in rituximab era. Leukemia and Lymphoma. 2010; 51: 2021-30.
7. Muris JJ, Cillessen SA, Vos W, Houdt IS, Kummer JA, Krieken JH, *et al.* Immunohistochemical profiling of caspase signaling pathways predicts clinical response to chemotherapy in primary nodal diffuse large

- B-cell lymphomas. *Blood*. 2005;105:2916-23.
8. Dahlan MS. Besar sampel dan cara pengambilan sampel dalam penelitian kedokteran dan kesehatan. Edisi 3. Jakarta: Salemba Medika; 2013. p.46.
  9. Dahlan MS. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan. Edisi 4. Jakarta: Salemba Medika; 2009. p.26-7.
  10. Mitrovic Z, Ilic I, Aurer I, Kinda SB, Radman I, Dotlic S, *et al*. Prognostic significance of survivin and Caspase-3 immunohistochemical expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab and CHOP. *Pathol Oncol Res*. 2011; 17: 243-7.
  11. Habara T, Sato Y, Takata K, Iwaki N, Okumura H, Sonobe H, *et al*. Germinal center B-cell-like versus non-germinal center B-cell-like as important prognostic factor localized nodal DLBCL. *J Clin Exp Hematopathol*. 2012; 52: 91-9.
  12. Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2000; 24: 846-52.
  13. Falini B, Fizzotti M, Pileri S, Liso A, Pasqualucci L, Flenghi L. Bcl-6 protein expression in normal and neoplastic lymphoid tissues. *Ann Oncol*. 1997;8:101-4.
  14. Natkuman Y, Warnke RA, Montgomery K, Falini B, Rijn M. Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. *Mod Pathol*. 2001;14:686-94.
  15. Soung YW, Lee JW, Kim SY, Park WS, Nam SW, Lee JY, *et al*. Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum Genet*. 2004; 115: 112-5.
  16. Berge RL, Meijer CJ, Dukers DF, Kummer JA, Bladergroen BA, Vos W, *et al*. Expression levels of apoptosis-related proteins predict clinical outcome in anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2002; 99: 4540-6.
  17. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011; 30: 1-14.